Der Einfluß der Galle und Gallenbestandteile auf die Fettsäure- und Cholesterinsynthese

Adolf Friedrich Lill

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0072

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Der Einfluß der Galle und Gallenbestandteile auf die Fettsäure- und Cholesterinsynthese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Adolf Friedrich Lill
aus Falkenau a. d. Eger

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. med. W. SEITZ
Korreferent: Professor Dr. med. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 8. 10. 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

MEINEN LIEBEN ELTERN

GEWIDMET

DISPOSITION

I. EINLEITUNG

A. DIE BEDEUTUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DER GALLENFLÜSSIGKEIT
B. DIE SYNTHESE DER FETTSÄUREN
C. DIE CHOLESTERINSYNTHESE
D. DER AUFBAU UND DIE BEDEUTUNG DES ATP

II. EXPERIMENTELLER TEIL

DARSTELLUNG DES ENZYMSYSTEMS
INKUBATION
DARSTELLUNG VON SYNTHETISIERTEN C^{14}-FETTSÄUREN UND C^{14}-CHOLESTERIN
BESTIMMUNG DER RADIAKTIVITÄT DER HÖHEREN FETTSÄUREN
AUFBEREITUNG UND AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DES C^{14}-CHOLESTERINS
DER ATP-FERMENT-TEST

III. ERGEBNISSE

A. DER EINFLUSS AUF DIE SYNTHESE VON HÖHEREN FETTSÄUREN UND CHOLESTERIN

1. unter Zugabe von Galle-Trockenpulver

2. unter Zugabe der einzelnen Gallenbestandteile

B. DAS VERHALTEN DES ATP-SPIEGELS BEI ZUGABE VON GALLE

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

A. DIE BEDEUTUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DER GALLENFLÜSSIGKEIT

Die in der Leber gebildete Galle ist sowohl Sekret wie auch Exkret. So haben die gallensäuren Salze eine große Bedeutung für die Resorption der Nahrungsstoffe, gleichzeitig werden aber mit der Galle auch Endprodukte des Stoffwechsels, wie Gallenfarbstoffe und inaktivierte Hormonderivate, ausgeschieden.

Die Gallenflüssigkeit enthält eine Reihe von Bestandteilen:
Gallensäuren und Gallenfarbstoffe, gepaarte Schwefel- und Glucuronsäuren, Cholesterin und Lecithin, Mucin, Phosphatasen, sowie anorganische Substanzen. Die Lebergalle ist gelb, dünnflüssig und enthält 3-4 % feste Bestandteile, während die Blasengalle mit 8-10 % festen Stoffen grünlich und von zäher Konsistenz ist.

Zusammensetzung von Lebergalle und Blasengalle des Menschen

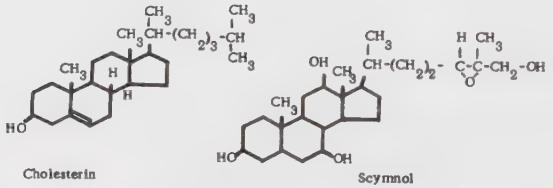
in g/l	Lebergalle	Blasengalle
Wasser	967 - 977	820
Trockensubstanz	23 - 33	180
Gesamt-N	0,7 - 0,9	4,9
Gesamt-P	0,1 - 0,2	1,4
Cholin	0,4 - 0,9	5,5
Gallensaure Salze	7,0 - 14,0	115
Fettsäuren	1,6 - 3,4	24
Lecithin	1,0 - 5,8	35
Cholesterin	0,8 - 2,1	4,3
Protein	1,4 - 2,7	4,5
Bilirubin	0,32 - 0,62	1,4
Gesamtkohlehydrate	0,4 - 0,9	2,4
Reduzierende Zucker	0,2 - 0,5	0,8
Anorganische Stoffe	9,0 - 10,0	5,0
Spezifisches Gewicht	1,010	1,040

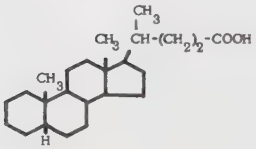
Von diesen Bestandteilen kommt den gallensauren Salzen die größte Bedeutung zu.

Die Gallensäuren, deren Konstitutionsaufklärung WINDAUS und WIELAND glückte, sind aufs engste mit dem Cholesterin verwandt. Ihrem Aufbau liegt ebenfalls ein polyzyklischer Kohlenwasserstoff zugrunde. BLOCH und Mitarbeiter konnten tatsächlich zeigen, daß Gallensäuren aus Cholesterin gebildet werden können.

Durch oxydativen Abbau der Seitenkette des Cholesterins um 3 C-Atome und Aufhebung der Doppelbindung zwischen C5 und C6 gelangt man zu den Gallen-

säuren, wobei das von HAMMARSTEN in der Haifischleber gefundene Scymnol, das ebenso wie die Cholsäure 3 OH-Gruppen in α-Stellung besitzt, als Zwischenstufe anzusehen ist.





Cholansäure, die Grundsubstanz der speziellen Gallensäuren.

Die Gallensäuren durchlaufen ähnlich wie die Gallenfarbstoffe einen enterohepatischen Kreislauf. Sie werden in der Leber gebildet und kommen nach Ausscheidung in den Darm dorthin zurück, um von neuem ausgeschieden zu werden.

Die Gallensäuren kommen als Alkalisalze, gebunden an stickstoffhaltige Körper, dem Taurin und Glykokoll, vor. Daneben enthält die Galle auch etwa 20 % der Gesamtgallensäuren als freie Gallensäuren. Obwohl sie kaum Fermente enthält, ist sie dennoch für die Verdauung von eminenter Bedeutung.

Mittels ihrer Basizität, sowie der Oberflächenaktivität der gallensauren Salze hilft sie bei der Emulsionsbildung der Fette, so daß nun die Pankreaslipase besser angreifen kann. Sie steigert die Lipaseaktivität und bildet wasserlösliche Molekülverbindungen, wodurch die Fettsäuren besser resorbiert werden können. Das in der Galle enthaltene Cholesterin vermag mit den Fettsäuren Ester zu bilden, die leicht die Darmwand passieren können. Bemerkenswert ist der choleretische Effekt, sowie die positive Wirkung auf die Dünndarmmotorik. Treten bei Ikterus im Blut vermehrt Gallensäuren auf, so hat dies Bradykardie und Juckreiz zur Folge.

Die Gallenflüssigkeit hat also eine mannigfaltige sekretorische wie auch exkretorische Bedeutung, und es erhebt sich die Frage, ob sie nicht auch Einfluß auf den intermediären Stoffwechsel nimmt.

B. DIE SYNTHESE DER FETTSÄUREN

Der Tierkörper baut die Fettsäuren mittels der ß-Oxydation bis zu Kohlensäure und Wasser, jeweils unter schrittweiser Abspaltung eines C_2-Körpers, ab. Franz KNOOP stellte diese Theorie schon 1904 auf, nachdem er in Fütterungsversuchen mit phenylsubstituierten Fettsäuren mit gerader und ungerader Anzahl von C-Atomen im Urin der Versuchstiere Hippursäure bzw. Phenacetursäure nachweisen konnte.

C_6H_5-CH_2-CH_2-COOH —ß-oxyd.→ C_6H_5-COOH + NH_2-CH_2-COOH

Phenylpropionsäure — Benzoesäure — Glykokoll

→ C_6H_5-CO-NH-CH_2-COOH

Hippursäure

C_6H_5-CH_2-CH_2-COOH —ß-oxyd.→ C_6H_5-CH_2-COOH + NH_2-CH_2-COOH

Phenylbuttersäure — Phenylessigsäure — Glykokoll

→ C_6H_5-CH_2-CO-NH-CH_2-COOH

Phenacetursäure

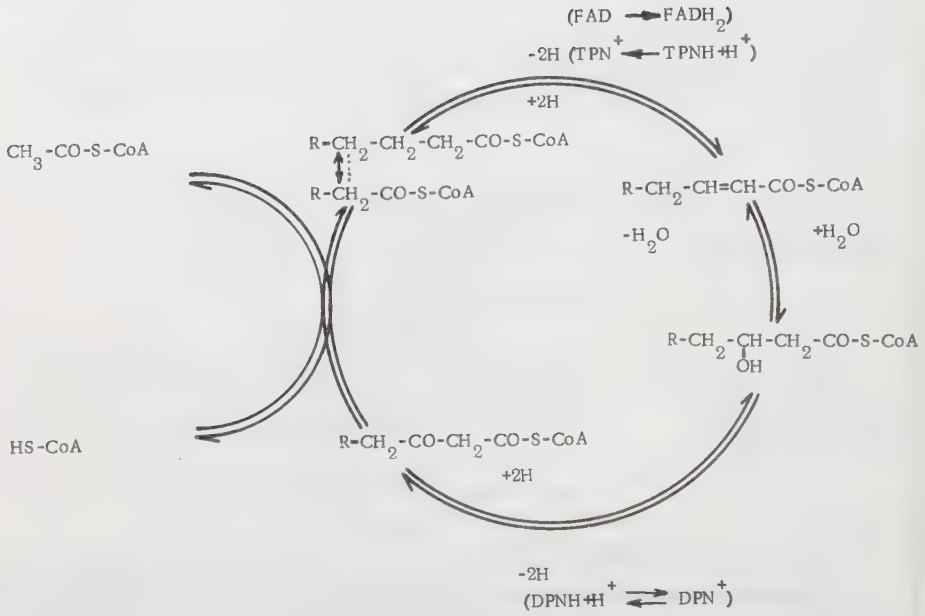
Nach Einführung der Isotopenmethode durch G. V. HEVESY in die experimentelle Biochemie konnten SCHÖNHEIMER, RITTENBERG, BLOCH, WEINHOUSE, GURIN, sowie viele andere die Annahme der ß-Oxydation im Versuch bestätigen, nachdem auch durch MUNOZ und LELOIR geeignete Fermentsysteme gefunden worden waren. Aber erst nach der Entdeckung des Coenzyms A (Co-A) durch NACHMANNSOHN und davon unabhängig durch LIPMANN ist es vornähmlich LYNEN gelungen, die Fettsäuresynthese in ihren Einzelheiten aufzuklären.

Danach reagiert nicht die freie Säure, sondern "aktivierte Essigsäure", die mit dem am Schwefel acetylierten Coenzym A (Co-A)-S-OC-CH_3 identisch ist.

Die Fettsäuren sind nur in dieser Form reaktionsfähig, was auch von grosser energetischer Bedeutung ist, da beim Zerfall dieser Verbindung 1200 cal/Mol frei werden.

Der Fettsäureaufbau ist die Umkehr des Abbaus und geschieht durch Anlagerung einer aktivierten Essigsäure.

So gab LYNEN folgenden reversiblen Kreisprozeß an, den er Fettsäurezyklus nannte.



Dieser Zyklus läuft in vier Reaktionsschritten ab. In Richtung der Synthese tritt am ersten Enzym die Kondensation einer gesättigten Fettsäure-CoA-Verbindung mit Acetyl-CoA ein, wobei ein CoA abgespalten wird.

$$R\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + CH_3\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA \rightleftharpoons R\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + CoA\text{-}SH$$

(ß-Ketosäure-CoA)

Die nächste Reaktion besteht darin, daß die ß-Ketosäure-CoA-Verbindung durch DPNH reduziert wird. Als Ferment wirkt dabei die ß-Oxyacyldehydrogenase, die von LYNEN ebenso wie die ß-Ketothiolase in der Leber nachgewiesen wurde.

$$R\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + DPNH + H^+ \rightleftharpoons R\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + DPN^+$$

(L(+)-ß-Oxybutyryl-CoA)

Auf der folgenden Stufe erfolgt die reversible Wasserabspaltung mit Hilfe des Enzyms Crotonase, dessen Entwickung STERN und del CAMPILLO 1953 aus Leber und Herzmuskel gelang.

Es entsteht hierbei Crotonyl-CoA

$$R\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA \xrightleftharpoons{\text{Crotonase}} R\text{-}CH{=}CH\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + H_2O$$

(Crotonyl-CoA)

Dabei nimmt man an, daß die Crotonase als cis-trans-Isomerase wirken kann; was für den Abbau von ungesättigten Fettsäuren von Wichtigkeit sein dürfte.

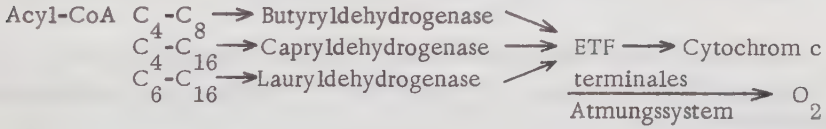
Im letzten Schritt wird schließlich die -ß ungesättigte Verbindung hydriert. So erhält man ein um 2 C-Atome verlängertes gesättigtes CoA-Derivat.

$$R\text{-}CH{=}CH\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + FADH_2 \rightleftharpoons R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}S\text{-}CoA + FAD$$

(Butyryl-CoA)

Hierbei finden je nach Kettenlänge drei verschiedene Flavinproteide als Enzyme Verwendung. Derivate der Säuren C_4-C_8 werden von der Butyryldehydrogenase, höherwertige Säureabkömmlinge von Capryldehydrogenase bzw. von Lauryldehydrogenase umgesetzt. Der für den Aufbau der Fettsäuren benötigte Wasserstoff wird nach LYNEN durch Überführung von TPNH auf Crotonyl-CoA gewonnen.

CRANE und BEINERT fanden, daß noch ein zweites gelbes Atmungsferment, das "Electron transferring flavoprotein" (ETF) erforderlich ist, da es die Reaktion zwischen reduzierter Butyryldehydrogenase und dem Farbstoff steuert.

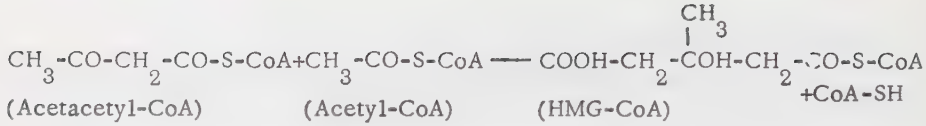


C. DIE CHOLESTERINSYNTHESE

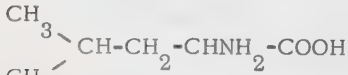
Analog zur Synthese der Fettsäuren erfolgt die Bildung des Cholesterins im Organismus aus aktivierter Essigsäure, was SONDERHOFF und THOMAS 1937 nachweisen konnten. Versuche von BLOCH haben ferner ergeben, daß alle 27 Kohlenstoffatome des Cholesterins von der Essigsäure stammen. Aber erst in neuester Zeit konnten alle Zwischenprodukte, die bei der Synthese auftreten, gesichert werden.

Die ersten zwei Reaktionsschritte laufen mit dem Aufbau der Fettsäuren gleich. Es ist dies die Aktivierung der Essigsäure und die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zum Acetacetyl-CoA.

Durch Anlagerung einer weiteren Molekel Acetyl-CoA erhält man, wie LYNEN nachwies, die ß-Hydroxy-ß-methyl-glutarsäure (HMG-CoA)

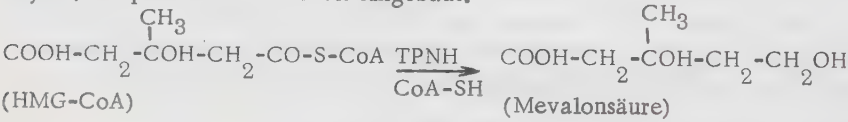


Dieses HMG-CoA kann aber auch durch Abbau des ketogenen Leucin gewonnen werden, wobei hier eine Ausweichmöglichkeit in der Cholesterinsynthese entsteht, da außerdem aus HMG-CoA in der Säugetierleber die Ketonkörper gebildet werden können.



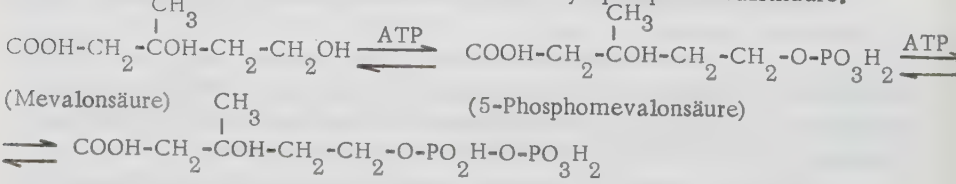
Im weiteren Verlauf wird dann HMG-CoA zu Mevalonsäure reduziert, wobei das TPNH den benötigten Wasserstoff bereitstellt.

Die Mevalonsäure wird nicht nur in die Sterine, sondern auch in Carotine, Phytol, Terpene und Kautschuk eingebaut.



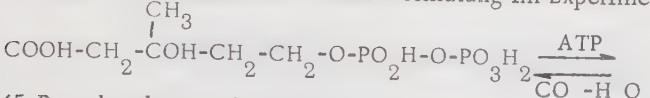
Die Mevalonsäure, die von K. FOLKERS 1956 als Wuchsstoff des Lactobazillus acidophilus entdeckt worden war, ist mit der ß- δ -dihydroxy-ß-methyl-valeriansäure identisch.

Der nun folgende Schritt wurde erst 1958 von LYNEN und Mitarbeitern nachgewiesen. Dabei wird die Mevalonsäure bei Anwesenheit von ATP und einer Kinase in 5-Stellung zu Phosphomevalosäure phosphoryliert. Durch erneute Phosphorylierung mit Hilfe von ATP erhält man schließlich 5-Pyrophosphomevalonsäure.

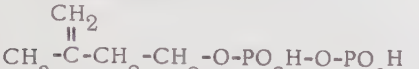


Als nächste Zwischensubstanz in Richtung des Aufbaus konnte Isopentenylpyrophosphat gesichert werden, was unter ATP-Verbrauch aus der 5-Pyrophosphomevalonsäure gebildet werden kann. Man vermutete, daß es sich hierbei um das lange

gesuchte "Aktive Isopren" handle, aus dem die höhermolekularen Terpene entstehen. LYNEN konnte 1957 diese Vermutung im Experiment bestätigen.

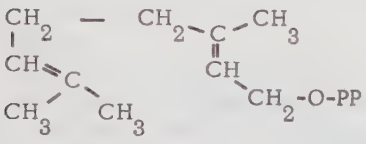


(5-Pyrophosphomevalonsäure)

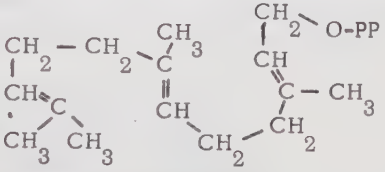


(Isopentenyl-pyrophosphat)

Kondensiert nun dieses Isopentenylpyrophosphat mit dem isomeren Dimethylallyl-pyrophosphat (D mal PP), so entsteht das Geranyl-pyrophosphat, das nun seinerseits mit einem zweiten Isopentenyl-pyrophosphat zu Parnesylpyrophosphat kondensiert.

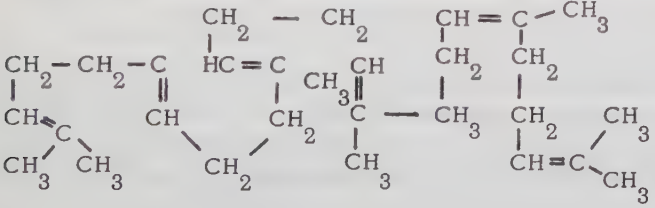


(Geranylpyrophosphat)



(Farnesylpyrophosphat)

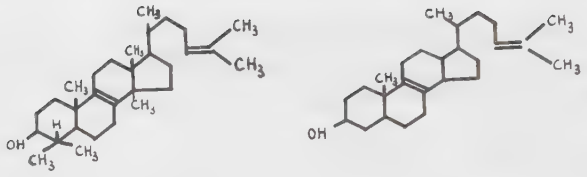
Zwei Molekel Farnesylpyrophosphat vereinigen sich auf der nächsten Stufe der Cholesterinsynthese zu Squalen, das schon 1926 von HEILBRON und anderen in seiner Struktur aufgeklärt worden war und reichlich in Haifischleber vorkommt. Der benötigte Wasserstoff stammt wiederum vom TPNH.



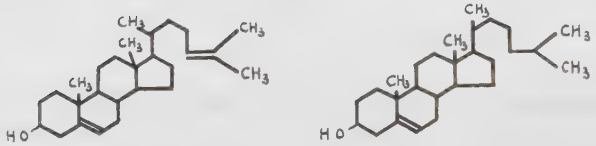
(Squalen)

Die Bildung des Cholesterins aus Squalen gelang schon 1953 LANGDON und BLOCH bei Isotopenversuchen an Mäusen. RUZICKA, WOODWARD und BLOCH konnten schließlich noch Zwischenprodukte dieser Umwandlung erfassen.

So bildet sich aus Squalen ($C_{30}H_{50}$) durch Oxydation und Ringschluß Lanosterin ($C_{30}H_{50}O$), wobei auch zwei Methylgruppen verschoben werden (C_{14} nach C_{13} und C_8 nach C_{14}).



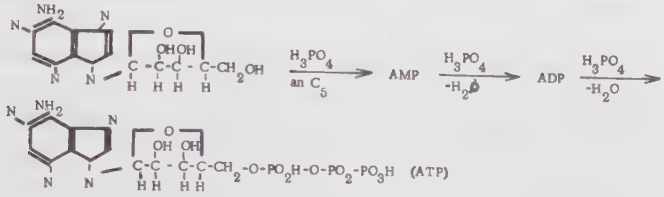
Zymosterin entsteht aus Lanosterin nach Abgabe von drei Methylgruppen, wobei auch das isomere Desmosterin gebildet wird, das dann zu Cholesterin wird.



D. DER AUFBAU UND DIE BEDEUTUNG DES ATP

Für das Zustandekommen eines chemischen Prozesses ist vielfach eine "Aktivierungsenergie" notwendig. Im lebenden Organismus verlaufen solche Vorgänge, die Energie verbrauchen, als gekoppelte Reaktionen, d.h. ein energieverbrauchender Prozeß ist mit einem solchen, der Energie bereitstellt, verbunden. Die wichtigste Energiequelle im Zellgeschehen stellt die Adenosintriphosphorsäure (ATP), die beim anaeroben wie beim aeroben Abbau der Nahrungsstoffe entweder durch Substratphosphorylierung oder durch Atmungskettenphosphorylierung gewonnen wird, dar. Die Ausgangssubstanz bei der Bildung von ATP ist die Muskeladenylsäure, die in der frischen Muskulatur vorkommt. Aus dieser Muskeladenylsäure (AMP), einem Adeninmononukleotid, das den Phosphorsäurerest am C_5 der Ribose trägt, erhält man durch glykolytische oder oxydative Phosphorylierung von zwei Molekülen Phosphor-

säure das ATP. Aber auch durch Addition einer Phosphorsäure an Adenosindiphosphorsäure (ADP) entsteht ATP.



Die Phosphorsäuren sind hier also unter Bildung einer Anhydridbindung aneinandergeknüpft. Bei der Aufspaltung eines Mol ATP werden daher 8000 cal frei. Eine regulierende Funktion beim Auf- und Abbau des ATP übernimmt dabei das innersekretorische System, das nach Herbrand und Jäger das ATP-Angebot nach dem Verbrauch richtet, da ja die Zellatmung ein solches Gleichgewicht voraussetzt.

Diese Atmung wird in drei Phasen eingeteilt.

a) die Bildung von energiereichem Phosphat
b) Transphosphorylierung auf ADP oder AMP
c) Spaltung des ATP

Zwischen diesen drei Stufen besteht in jeder arbeitenden Zelle ein Fließgleichgewicht, was für den Lebensprozeß von besonderer Bedeutung ist (LIPMANN 1941).

Die im ATP gespeicherte Energie wird vornehmlich für den Stoffwechsel verbraucht.

Die wohl wichtigste Umsetzung ist die Gewinnung von Phosphokreatin, einer Reserve des Muskels an energiereichem Phosphat, mit Hilfe des Enzyms Kreatinphosphokinase aus Kreatin und ATP.

$$\text{ATP + Kreatin} \underset{\text{kinase}}{\overset{\text{Kreatinphospho-}}{\rightleftharpoons}} \text{Kreatinphosphosäure + ADP}$$

Von großer Bedeutung ist ferner die Hexokinasereaktion, wobei die Säureanhydridbindung in eine Esterbindung übergeführt wird. Dabei werden so große Energiemengen frei, so daß praktisch eine Umkehr nicht statthat.

$$\text{Glukose + ATP} \longrightarrow \text{Glukose-6-phosphat + ADP}$$

Phosphatasen bewirken die Verschiebung von Phosphatresten zwischen einem

Ester und einem Alkohol. Dabei ist die Umsetzungsgeschwindigkeit für diese Transphosphorylierung abhängig vom Energiegefälle zwischen dem Donator und dem Acceptor.

ATP wird auch bei der Bildung der glykosidischen Bindung zu Synthesezwekken verbraucht; denn es muß dabei erst ein aktivierter Glykosylrest gebildet werden, ähnlich wie auch die Säureamid- und Peptidbindung auf Kosten von ATP geschaffen wird.

$$R\text{-}OH + R'\text{-}OH \xrightarrow{ATP} R\text{-}O\text{-}R' \quad \text{(Glykosidbildung)}$$

$$R\text{-}COOH + NH_3 \xrightarrow{ATP} R\text{-}CO\text{-}NH_2 \quad \text{(Säureamidbildung)}$$

$$R\text{-}COOH + NH\text{-}R' \xrightarrow{ATP} R\text{-}CO\text{-}NH\text{-}R' \quad \text{(Peptidbildung)}$$

Wir kennen auch Reaktionen, bei denen sich eine aktivierte Säure an eine andere Verbindung anlagert. Hier wird unter ATP-Verbrauch ein energetisch höheres Niveau erreicht, so daß die Bildung einer neuen Ester- oder Säureamidbindung durch Austausch erfolgen kann.

Das ATP spielt schließlich bei einer Anzahl von Fermenten, wie z.B. beim Uridincoferment, als auch bei gewissen Vitaminen eine entscheidende Rolle.

Da das energiereiche Phosphat außerdem für die Strukturerhaltung der Zelle, besonders durch die Wirkung auf die Mitochondrien und das zellgebundene Fermentsystem eine große Bedeutung hat, wird verständlich, daß ATP für den intermediären Stoffwechsel unentbehrlich ist und sein Fehlen mit dem Leben nicht zu vereinbaren ist.

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung der Gallenbestandteile auf die Synthese von Fettsäuren und Cholesterin, sowie der Einfluß auf den Gehalt an ATP in Abhängigkeit von der erzielten Höhe der Fettsäuresynthese untersucht werden.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Durchführung der Versuche benötigt man ein fettsäuresynthetisierendes Enzymsystem von besonders hoher Wirksamkeit. Ein Homogenat, aus Taubenleber präpariert, erfüllt diese Forderung am ehesten, da es etwa 15 % des zugesetzten C^{14}-Natriumacetats im Gegensatz zu nur 5 % bei Ratten- und Schweineleberhomogenaten zu höheren Fettsäuren und Cholesterin aufzubauen in der Lage ist.

Wir verwenden junge bis 6 Monate alte Tauben, die vorher reichlich mit Kohlehydraten gefüttert werden, da dies eine maximale Ausbeute an synthetisierten Fettsäuren und Cholesterin ergibt.

DARSTELLUNG DES ENZYMSYSTEMS

Je nach Zahl der Versuchsansätze werden 4-5 Tauben mittels Scherenschlag dekapitiert. Die Lebern werden zur Erhaltung der wirksamen Fermente sofort entnommen, in aqua dest. von 0°C gebracht und kurz gewaschen. Hierauf werden sie von Bindegewebe gesäubert, mit Filterpapier getrocknet und gewogen. Zur Bereitung eines zellfreien Enzymsystems (supernatant fluid) wird der gewichtsmäßig bestimmten Menge Leber im Verhältnis 1:1,5 ein Puffergemisch zugesetzt. Die verwendete Pufferlösung besteht aus 11,876 g Na_2HPO_4, 9,078 g KH_2PO_4 und 7,0 g $KHCO_3$ auf 1000 ml aqua dest.. Ein Gramm Leber entspricht 0,8 ml. Dieses Gemisch wird dann im Potter-Elvehjem-Homogenisator ausreichend zerkleinert, wobei die Zellwände weitgehend zerstört werden. Das dabei erhaltene homogene Leber-Puffer-Gemisch wird 45 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute abgeschleudert, wobei sich zwei Fraktionen bilden. Der Überstand wird abgegossen und mit der gleichen Pufferlösung in der Weise verdünnt, daß 2,4 ml einer Ausgangsmenge von 1 g Leber entsprechen. Die Lösung wird weitere 75 Minuten bei 25000 U/min zentrifugiert.

Das von BRADY und GURIN geforderte Abschleudern bei 100000 U/min muß in Ermangelung einer Ultrazentrifuge unterbleibens so daß der erhaltene Überstand zwar frei von gröberen Zellbestandteilen ist, jedoch noch Mitochondrien und Mikrosomen enthält. Der Eiweißgehalt dieses "supernatant fluid" beträgt nach v. BRAND und HELMREICH im Mittel 35,3 mg ± 2 mg entsprechend 5,6 mg N.

INKUBATION

Das Enzympräparat wird nun zusammen mit verschiedenen Reagentien in Warburg-Gefäße größeren Volumens gebracht und vier Stunden bei 38°C ± 0,1° C im Warburg-Apparat inkubiert. Als konstante Zusätze verwenden wir $MgCl_2$ in der optimalen Konzentration von 6×10^{-3}m wegen der aktivierenden Wirkung auf das Enzymsystem. Ferner setzen wir 0,1 ml o,01 m Na-citrat zu, das den Einbau von C^{14}-Acetat in höhere Fettsäuren und Cholesterin ermöglicht. Ohne Zusatz von Citrat wird keine oder nur eine minimale Fettsäuresynthese erzielt.

Die Versuchsansätze beinhalten im allgemeinen folgendes:

0,1 ml $MgCl_2$	0,006 m
0,1 ml Na-citrat	0,01 m
0,4 ml Akt. Acetat	0,008 m
2,3 ml Enzymsystem	
0,1 ml andere Zusätze (Puffer etc.)	
3,0 ml Gesamtvolumen	

Der pH-Wert dieses Gemisches beträgt 7,2-7,4 und soll während der Inkubation gleichbleiben. Die Gasphase ist aerob.

DARSTELLUNG VON SYNTHETISIERTEN C^{14}-FETTSÄUREN UND C^{14}-CHOLESTERIN

Die Ansätze werden nach den Vorschriften von BRADY und GURIN aus dem Warburggefäß mit 5 ml aqua bidest. in ein birnenförmiges Schliffkölbchen übergespült und nach Zugabe von 5 ml 30 % alkohol. KOH und 25 mg Palmitinsäure unter Rückfluß 4 Stunden verseift. Die Palmitinsäure dient als Trägersubstanz, um die spätere Titration zu erleichtern. Ist die Lösung abgekühlt, wird sie mit 15-20 ml Petroläther(Sdp. 30^{o}-50^{o} C) zusammen mit 5 Tropfen Bromkresylgrün-Methylorange als Indikator in einen Scheidetrichter gefüllt und mit 18 % HCl bis zum Farbumschlag titriert. Durch viermaliges Extrahieren mit Petroläther werden aus dem Verseifungsgemisch die höheren Fettsäuren und Cholesterin herausgelöst, auf dem Wasserbad eingedampft und schließlich auf 10 ml mit Petroläther aufgefüllt. Diese 10 m Lösung enthalten alle isolierten Fettsäuren und Cholesterin.

BESTIMMUNG DER RADIAKTIVITÄT DER HÖHEREN FETTSÄUREN

Von diesem Gemisch wird 1 ml auf ein mit lenspaper belegtes Aluminiumplättchen mit Rand (Durchmesser 2,5 cm) langsam aufgetropft. Die Bestimmung der Radioaktivität geschieht nach der direkten Methode von Entenman. Dabei erfolgt die Messung mit einem ß-Fensterzählrohr dünner Belegung (1 mg/cm^2)[2] bei gleichem geometrischen Abstand und gleicher Arbeitsspannung.

Die Aktivitäten werden in Impulsen/Minute angegeben. Korrekturen der Werte werden gemäß den Richtlinien der "Isotopic Carbon" unter Verwendung einer C^{14}-Standardfolie vorgenommen. Bei einem Versuchsansatz werden gewöhnlich 30 mg Fettsäure unter Hinzuzählung der 25 mg Trägersubstanz gefunden. Der Blindwert, ermittelt ohne Zugabe des aktiven Enzymsystems beträgt höchstens 5-6 % der normalen Aktivität.

AUFBEREITUNG UND AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DES C^{14}-CHOLESTERINS

Die Darstellung des Cholesterins läuft bis zur Messung der Fettsäuren mit diesen parallel.

Von den 10 ml des Petrolätherauszuges werden 5 ml im Wasserbad vollständig eingedampft. Der Rückstand wird in 4 ml Bloor-Lösung (3 Teile Alkohol 96 % und 1 Teil Äther) gelöst und gegen Phenolphthalein als Indikator mit KOH alkalisch bis zum Farbumschlag von farblos auf rot gemacht. Dieses Gemisch wird hierauf im Wasserbad ca. eine Stunde bei 37^{o} C verseift und mit 10 % Essigsäure schwach angesäuert. Mit einer 1 % Digitoninlösung wird nach Zugabe von 5 mg Cholesterin zur besseren Abscheidung die Cholesterinfällung durchgeführt.

Die Lösung wird durch ein vorher gewogenes Filterplättchen gesogen, das nach Waschen mit einem Alkohol-Äthergemisch (Verhältnis 1:1) und Trocknen wiederum gewichtsmäßig bestimmt wird. Die Messung der Impulse des auf dem

Plättchen befindlichen C^{14}-Cholesterins wird im Methandurchflußzählrohr bei gleichen Bedingungen hinsichtlich der Arbeitsspannung und des geometrischen Abstandes vorgenommen.

Die Impulszahl wird pro Minute, umgerechnet jeweils auf das tatsächliche Gewicht und auf die Gesamtmenge bezogen, angegeben.

DER ATP-FERMENT-TEST

Die Testmethode wurde von W. LAMPRECHT in einer etwas veränderten Weise übernommen. Schon O. WARBURG und A. KORNBERG hatten auf die Möglichkeit der ATP-Bestimmung hingewiesen. Die Testreaktion läuft in zwei Schritten ab, wobei der erste die schon in der Einleitung erwähnte Hexokinasereaktion ist.

$$\text{ATP + Glukose} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glukose-6-phosphat + ADP}$$

Der zweite Schritt ist TPN abhängig, wobei TPNH entsteht, dessen quantitative Bestimmung ein Maß für den ATP-Gehalt ist.

$$\text{Glukose-6-phosphat + TPN} \xrightarrow{\text{Zwischenferment}} \text{6-Phosphoglukonsäure} + \text{TPN-H + H}$$

TPN-H kann quantitativ im EPPENDORFSCHEN Photometer bestimmt werden, da TPN-H eine Adsorptionsbande bei 334 m hat und eine Zunahme der Adsorption beim Entstehen von TPN-H erfolgt. Zur Durchführung der Testmethode wird der Gesamtansatz im Warburgtrog auf 4,0 ml vergrößert. Nach der Inkubation werden 1,0 ml des Ansatzgemisches abpipetiert und mit 1,0 ml eiskalter Perchlorsäure 0,6 m enteiweißt. Die Lösung wird sofort bei 0^{o} C unter 25000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und mit 0,5 n Kalilauge unter ständigem Rühren bis pH 7,4 neutralisiert. Der pH-Wert wird mit einer Sondenelektrode des BECKMANN-pH-Meters gemessen. Nun wird das Neutralisat mindestens 10 Minuten im Eisschrank zur Abscheidung des gebildeten $KClO_4$ stehen gelassen; dann werden 1-2 ml abgegossen und ins Eisbad gestellt.

Der optische Test wird im EPPENDORF-Photometer durchgeführt. Hierzu wird das Photometer mit einem Filter für 334 m und einem 2 cm Nickelsulfatfilter auf den Nullwert geeicht. In eine Glasküvette von 2 cm Schichtdicke werden 4,0 ml Tri-Athanol-Puffer: 9,3 g Triäthanol in 500 ml aqua bidest. lösen, mit 22 ml NaOH auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen, 0,4 ml 0,5 m Glukose und o,2 ml o,1 m $MgCl_2$Lösung gefüllt. Mittels einer Pipette setzt man 2,0 ml der zu testenden Lösung und 0,05 ml TPN-Lösung (2 mg TPN auf 1,0 ml aqua bidest.) zu. Die Küvette wird in den Photometer eingebracht und die Extinktion als Ausgangswert t notiert. Dann wird 0,05 ml einer Fermentlösung (15 mg Hexokinase und 2 mg WARBURG'sches Zwischenferment in 1 ml aqua bidest. aufgelöst) auf einem Glasspatel zugegeben und die Zeit gestoppt.

Man liest die Extinktionswerte alle zwei Minuten bis zum Stillstand der

Reaktion ab. Nach Messung der Eigenextinktion der Fermentlösung, die von der Extinktionsdifferenz abgezogen wird, ist die Testung beendet.

Die ATP-Werte werden in ATP/ml angegeben und werden in folgender Weise errechnet.

$$\frac{E \times \text{Vol ges.} \times \text{Vol über} \times M_{ATP}}{d \times \text{Vol test} \times \text{Vol lös.} \times mE_{ATP} \times 1000} = \text{ATP/1 ml}$$

wobei:
- d = Schichtdicke der Küvette in cm
- Vol ges. = Gesamtvolumen in der Küvette in ml
- Vol test = pro Küvette eingesetzte ATP-haltige Lösung in ml
- Vol lös. = Menge der dem Warburgtrog entnommenen Lösung in ml
- Vol über = Gesamtvolumen der enteiweißten und neutralisier-Lösung in ml
- E = wirkliche Extinktionsdifferenz
- M_{ATP} = Molekulargewicht von ATP
- mE_{ATP} = molare Eigenextinktion von ATP

Da die meisten Werte konstant sind, ergibt die vereinfachte Formel:

$$E \times 1,02 \times \text{Vol über} = \text{ATP/1 ml Lösung}$$

III. ERGEBNISSE

Für die Versuchsansätze wird ein von der Fa. KALI-CHEMIE hergestelltes Galle-Trockenpulver zugegeben, das nach Mitteilung der Herstellerin unter Eindampfen von flüssiger Galle ohne weitere Zusätze oder Fällungsmittel gewonnen wird.

In Parallelversuchen zeigten entsprechende Ansätze mit frischer, aus Drainage gewonnener Galle gleichartige Wirkung. Um aber auch den Einfluß der Gallenbestandteile nachweisen zu können, werden die einzelnen Substanzen auf ihre Wirksamkeit geprüft. Wir benützen dazu Präparate mehrerer chemischer Firmen in Reindarstellung.

A. DER EINFLUSS AUF DIE SYNTHESE VON HÖHEREN FETTSÄUREN UND CHOLESTERIN

1. unter Zugabe von Galle-Trockenpulver

Die Trocken-Galle ist in Wasser löslich. In den Versuchsansätzen wird eine wässrige Lösung der Trockengalle in variierender Konzentration zugegeben.

Fügt man 0,1 ml einer solchen Lösung (100 mg TrG auf 10 ml aqua dest.),

entsprechend 1 mg Trockengalle, zu, so wird eine Hemmung der Fettsäuresynthese von 70 % erzielt.

In der folgenden Tabelle ist die Höhe der Fettsäuresynthese bei Normalversuchen mit Versuchen nach Zugabe von 1mg Trockengalle gegenübergestellt.

Aktivitäten angegeben in Imp x 10^4/min pro Versuchsansatz

Normalansatz :	2,238	0,891	1,507	3,062	2,021	2,417	3,011
Ansatz mit TrG:	0,998	0,079	0,199	1,213	0,386	0,355	1,617
Normalansatz :	0,938	2, 838	0,892	1,711	1,563	0,633	0,989
Ansatz mit TrG:	0,203	1, 654	0,182	0,260	0,186	0,133	0,258

Dabei fällt auf, daß die Hemmwirkung zu einem gewissen Grad von der Ausgangsaktivität des Normalversuchs, also letztlich von der Qualität des Enzymsystems abhängig ist. Während die mittlere Hemmung der dargestellten Versuche bei 70 % liegt, macht der Einfluß auf die Ansätze mit einer Impulszahl unter 2,0 x 10^4 sogar 80 % aus, während bei den Versuchen über 2,0 x 10^4 Impulsen/min 60 % weniger Fettsäuren aufgebaut werden. Dieser Unterschied mag wohl im Ernährungszustand der Tiere, sowie in der Verschiedenheit des acetataktivierenden Enzymsystems begründet sein.

Eine ähnliche Wirkung im Sinne der Hemmung sieht man auch bei der Synthese des Cholesterins. Die Zugabe von 1 mg Trockengalle zum Versuchsansatz führt zu einer Verminderung des Cholesterinaufbaus um durchschnittlich 57 %.

Imp x 10^4/min pro Versuchsansatz

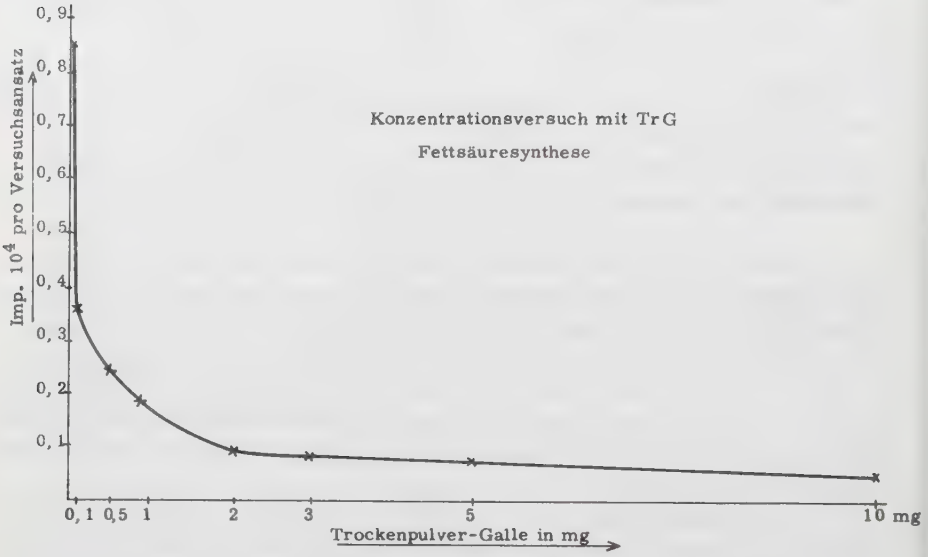
Normalansatz :	0,1500	0,0756	0,1070	0,4503	0,0734	0,2620
Ansatz mit TrG:	0,0680	0,0360	0,0425	0,1240	0,0493	0,1625

Versuchsreihen mit Zugabe wechselnder Mengen an Trocken-Galle zeigen, daß der hemmende Einfluß mit steigender Konzentration zunimmt.

Konzentrationsversuch mit TrG

a) bei der Fettsäuresynthese — Imp x 10^4 pro Ansatz

1	2	3	4	5	6	7	8	9
sup	sup	sup	sup	sup	sup	sup	sup	sup
	0,01 mg	0,1 mg	0,5 mg	1 mg	2 mg	3 mg	5 mg	10 mg
0,938	0,854	0,360	0,234	0,209	0,097	0,089	0,078	0,063
Hemmung:	8 %	62 %	75 %	78 %	89 %	91 %	92 %	93 %



Aus den Werten kann man entnehmen, daß bei den Ansätzen unter Zugabe von 1 mg Trockengalle bereits eine starke Hemmung von 78 % erzielt wird. Höhere Konzentrationen bewirken nur noch eine geringe Steigerung der Hemmung und sind vor allem auch nicht mehr physiologisch.

Die in gleicher Weise durchgeführten Versuche zur Cholesterinsynthese ergeben den selben Effekt, wobei auch hier die enge Beziehung zur Fettsäuresynthese gewahrt bleibt, wenngleich die Synthese durch höhere Gaben nicht so stark gehemmt ist.

Konzentrationsversuch bei der Cholesterinsynthese

Imp x 10^4/min pro Ansatz

1	2	3	4	5	6	7
sup	sup	sup	sup	sup	sup	sup
	0,01 mg	0,05 mg	0,1 mg	1 mg	3 mg	10 mg
0,0758	0,0705	0,0560	0,0523	0,0360	0,0268	0,0203
Hemmung:	7 %	25 %	33 %	52 %	65 %	67 %

Um feststellen zu können, welcher Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer der Versuchsansätze einerseits und der Menge der synthetisierten Fettsäuren andererseits besteht, wurden die Kölbchen nach verschiedener Bebrütungsdauer dem Apparat entnommen und die Aktivitäten gemessen. Beim Normalversuch, wie beim Versuch mit TrG wird in den ersten 20 Minuten durchschnittlich 34 %, nach 40 Minuten 43 %, nach 80 Minuten 68 % synthetisiert und nach 180 Minuten wird eine optimale Ausbeute erreicht, die auch durch Inkubieren bis zu 8 Stunden nicht mehr verbessert wird. In den ersten 3 Stunden wird offenbar das Enzymsystem und der Energievorrat unter ständig steigender Synthese verbraucht, so daß jetzt kein Aufbau mehr stattfinden kann, obwohl C^{14}-Acetat noch im Überschuß vorhanden ist.

Daß es sich bei der hemmenden Wirkung der Galle um einen rein physikalischen Vorgang, infolge der Oberflächenaktivität oder infolge von Bildung der Choleinsäuren, die nach WIELAND durch Emulgieren von 1 Mol Fettsäure mit 8 Mol Desoxycholsäure entstehen, handelt, kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Werden einem Normalversuch nach dreistündigem Bebrüten 1 mg Trockengalle zugesetzt und weitere 10 Minuten im WARBURG-Apparat geschüttelt, so weist er gegenüber einem Kontrollversuch keinen signifikanten Unterschied auf. Es kommt also nicht zu einer Bindung der schon aufgebauten C^{14}-Fettsäuren.

2. Veränderungen bei Zugabe der einzelnen Gallebestandteile

Von besonderem Interesse ist die Suche nach der wirksamen Substanz dieses Galle-Trockenpulvers. Es werden die Gallensäuren, die Gallenfarbstoffe, Lecithin und Cholesterin, sowie Mucin geprüft. Weitere Stoffe wurden bereits von anderen Autoren beschrieben oder befinden sich ohnehin im Ansatzgemisch, wie anorganische Ionen, Wasser und die Proteine. Die Kohlenhydrate verhalten sich zur Fettsäuresynthese neutral, was von GURIN sowie von v. BRAND und HELMREICH nachgewiesen wurde. Die Fettsäuren, die ja auch in der Galle vorkommen, haben nach Angabe eines anderen Arbeitskreises des Isotopenlabors einen gewissen hemmenden Einfluß.

Im Verlauf der Untersuchungen erkennt man, daß sich die einzelnen Gallensäuren, wie die Lithocholsäure, die Taurocholsäure, die Cholsäure, die Glykocholsäure, sowie das choleinsaure Natrium sehr ähnlich verhalten, so daß am Beispiel des choleinsauren Natrium der ausgeübte Effekt dargestellt wird. Das choleinsaure Natrium ist ebenfalls in Wasser löslich und wird in gewünschter Menge den Ansätzen zugegeben.

Bei Zugabe von 1 mg choleins. Natrium erfährt der Aufbau der Fettsäuren eine Minderung um 62 %.

	Imp x 10^4/min pro Versuchsansatz						
Normalansatz :	1,071	2,021	1,401	1,755	2,850	1,953	1,544
Ansatz mit chol. Na.:	0,101	0,615	0,712	0,688	1,267	1,002	0,385

Die Cholesterinsynthese wird in ähnlicher Weise beeinflußt. Hier beträgt die Hemmung durchschnittlich 46 %.

Auch Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Konzentration brachten Ergebnisse, die denen der Trockengalle sehr ähnlich sind.

				Imp x 10^4/min pro Versuchsansatz			
1	2	3	4	5	6	7	8
sup	sup	sup	sup	sup	sup	sup	sup
	0,05 mg	0,1 mg	0,5 mg	1 mg	2 mg	5 mg	10 mg
1,529	1,188	1,085	0,759	0,381	0,181	0,081	0,067
Hemmung:	22 %	29 %	50 %	70 %	88 %	95 %	96 %

Graphisch ausgetragen würden diese Werte, sowie die der analog verlaufenden Cholesterinsynthese wieder einen parabelförmigen Verlauf nehmen. Hinsichtlich der steigenden Inkubationsdauer gilt das gleiche wie bei Zugabe von Galle-Trockenpulver.

In gleicher Weise werden auch die weiteren Gallensäuren geprüft. Man findet gleichfalls eine Verminderung der Fettsäure- und Cholesterinsynthese. In der Reihenfolge der stärksten Hemmung steht die Glykocholsäure an erster Stelle. Bei Zugabe von 1 mg vermag sie die Fettsäuresynthese von 1,531 x 10^4 Imp/min auf 0,297 x 10^4 also um 80 % zu hemmen. An nächster Stelle steht die Taurocholsäure, wovon 1 mg den Aufbau von 1,531 x 10^4 Imp/min auf 0,419 um 73 % bremst. Die Lithocholsäure vermindert die Impulszahl von 1,859 x 10^4 auf 0,753 x 10^4 um 60 %. Die Cholsäure bewirkt schließlich eine Reduzierung von 1,859 x 10^4 Imp/min auf 0,973 x 10^4 Imp/min. Bei all diesen Versuchen ist auch das Cholesterin in gleicher Weise vermindert. Bei steigender Konzentration der zugegebenen Gallensäuren erhöht sich die Hemmwirkung.

Sogar die Gallenfarbstoffe scheinen die Synthese in Richtung einer Hemmung zu beeinflussen. So reduziert das Bilirubin die Impulszahl von 1,621 x 10^4 auf 1,384 x 10^4 und das Biliverdin von 3,811 x 10^4 auf 2,180 x 10^4. Freilich stellt dabei die Zugabe von 1 mg einen extrem unphysiologischen Wert dar.

Schließlich lösen noch Cholesterin und Lecithin bei steigender Konzentration eine steigende Abnahme der gebildeten C^{14}-Fettsäuren und C^{14}-Cholesterin aus. Dieser Effekt ist möglicherweise im Massenwirkungsgesetz begründet; d.h. daß auf der Seite des Aufbaus das Cholesterin und Lecithin stehen und das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Abbaus verschieben. Mucin, ein Gemisch aus Schwefelsäure, Essigsäure, Glukoronsäure und Glukosamin verhält sich indifferent.

Man erkennt, daß die überwiegende Mehrzahl der Gallenbestandteile, insbesondere die Gallensäuren in hemmender Weise Einfluß auf die Synthese von Fettsäuren und Cholesterin nehmen. Dabei fällt auf, daß das Gemisch aus diesen Substanzen, die Trockengalle, diese Wirkung nicht zu potenzieren vermag.

Vergleichende Versuche, die mit den choleretischen und cholagogenen Spezifika Felkreon und Decholin durchgeführt wurden, brachten gleiche Ergebnisse.

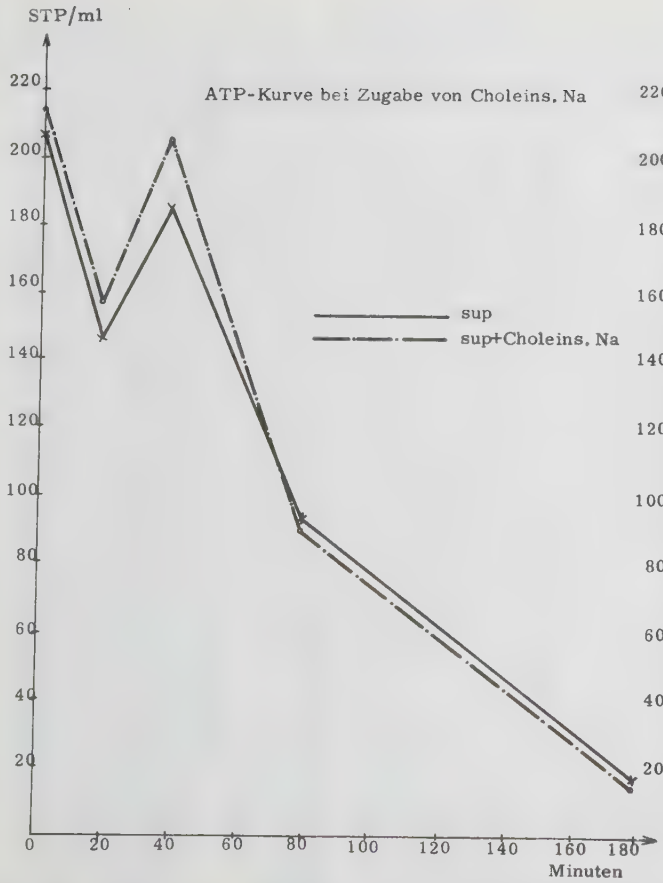
B. DAS VERHALTEN DES ATP-SPIEGELS BEI ZUGABE VON GALLE

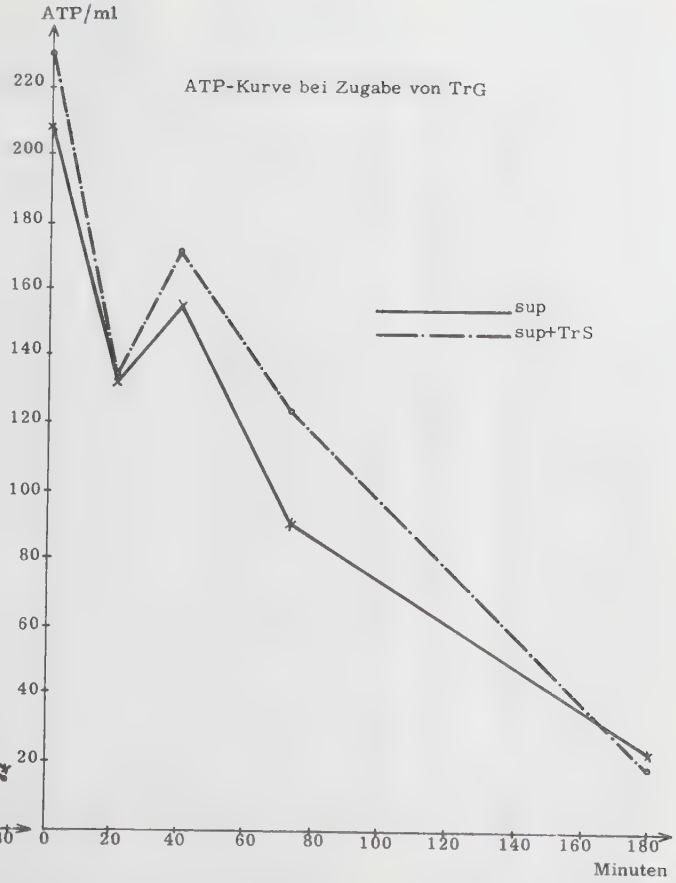
Schon länger wurde eine Beziehung der Glykolyse zu Synthese der Fettsäuren und des Cholesterins vermutet. Unter anderem haben v. BRAND und HELMREICH diese Annahme bestätigen können. Bei der Glykolyse wird ATP gewonnen, während zur Aktivierung von Acetat solches verbraucht wird. Da nun japanischen Autoren zufolge die Gallensäuren fördernd auf die Glykogenbildung und hemmend auf die Glykolyse einwirken, erscheint die Kenntnis des ATP-Gehaltes um so bedeutungsvoller, da man daraus ersehen könnte, ob die Hemmwirkung auf ATP-Mangel zurückzuführen ist.

Es werden Testversuche durchgeführt, die den ATP-Gehalt nach steigender Inkubationsdauer bis zu 180 Minuten aufzeigen. Wir wählen jeweils Versuchsansätze mit gleicher Konzentration an Trockengalle bzw. choleinsaurem Natrium. Die zugegebenen Mengen entsprechen den Versuchsansätzen bei der Fettsäuresynthese unter Verwendung von 1 mg Trockengalle bzw. choleinsaurem Natrium.

	ATP/1 ml									
	Normalansatz					Ansatz mit Trockengalle				
	0	20'	40'	80'	180'	0	20'	40'	80'	180'
1.	213,3	132,7	116,8	91,4	25,0	233,8	133,6	173,5	127,8	22,0
2.	156,3	113,2	71,4	146,2	25,1	127,9	115,8	103,2	154,7	22,1
3.	139,1	156,0	98,6	31,8	18,9	138,7	174,2	167,6	158,7	41,3
4.	107,3	167,0	117,6	31,4	9,5	104,7	187,9	104,2	37,9	3,3
Mittelwert:	154,0	142,2	101,1	75,2	19,6	151,3	152,9	137,1	119,8	22,4

	γ ATP/1 ml									
	Normalansatz					Ansatz mit chols. Natrium				
1.	156,3	113,2	71,4	146,2	25,1	181,4	102,9	115,8	154,4	21,9
2.	205,2	145,8	182,3	89,5	16,1	214,4	154,9	202,2	87,2	15,9


STP/ml
ATP-Kurve bei Zugabe von Choleins. Na
sup
sup+Choleins. Na
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Minuten


ATP/ml
ATP-Kurve bei Zugabe von TrG
sup
sup+TrS
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Minuten

Aus den Tabellen und aus der graphischen Darstellung ist zu entnehmen, daß eine absolute Verminderung des ATP-Angebotes eingetreten ist; denn die ATP-Kurve müßte bei Zugabe von Trockengalle und von choleinsaurem Natrium viel höher verlaufen, da ja weniger ATP zum Aufbau der Fettsäuren und des Cholesterins verbraucht wurde. Relativ ist jedoch genügend ATP vorhanden, um einen höheren Synthesewert zu erreichen.

IV. DISKUSSION

Mit Hilfe eines aus Taubenlebern gewonnenen, zellfreien, löslichen Enzymsystems werden höhere Fettsäuren und Cholesterin aus C^{14}-Acetat aufgebaut. Durch Zugabe von Galle-Trockenpulver, das die gleiche Wirkung wie flüssige Galle zeigt, wird diese Synthese gegenüber Vergleichsversuchen stark gehemmt. Dabei wird auch der ATP-Spiegel in den Versuchsansätzen gesenkt.

Gleichartige Ergebnisse werden auch unter Verwendung einer Reihe von Gallenbestandteilen, insbesondere bei den Gallensäuren, gefunden.

Mehrere Autoren, unter ihnen RAPPERT und KREUTZBERG, beschreiben eine Senkung des Lipidgehaltes im Blute beim Menschen unter Applikation von Dehydrocholsäure i. v.. Sie führen diese Wirkung auf die Emulsion der Fette, auf deren Verseifung und auf die Anregung des Galleflusses zurück, der nun die Wirkung der zugesetzten Gallensäuren fortsetzt und steigert.

RAPPERT berichtet, daß durch die Behandlung mit Dehydrocholsäure i. v. 35 % der an massiver Fettembolie Erkrankten geheilt werden konnten, während bei unbehandelten Fällen nur 2 % überlebten.

Sicher haben die Gallensäuren einen emulgierenden und verseifenden Einfluß, doch kann aus unseren Versuchen geschlossen werden, daß es sich hierbei nicht um einen rein physikalischen Effekt handeln kann. Werden nämlich einem Versuchsansatz nach dreistündigem Inkubieren Gallensäuren zugesetzt, so erfolgt keine signifikante Verminderung der meßbaren C^{14}-Fettsäuren. Es findet nur geringe Bindung infolge der Oberflächenaktivität oder die von WIELAND geforderte Bildung von Choleinsäuren statt.

Nach GURIN, sowie nach v. BRAND und HELMREICH ist die Fettsäuresynthese eng mit dem Kohlenhydratstoffwechsel verbunden. Bei der dissimilatorischen Glykolyse wird Energie gewonnen, wobei als Energielieferant Glukose, Fruktose, Galaktose und das polymersierte Glykogen in Frage kommen. Energie in Form von ATP ist aber zur Bildung der aktivierten Essigsäure, die dann zur Fettsäure- wie auch zur Cholesterinsynthese verwendet werden kann, erforderlich. Dadurch ist verständlich, daß sich Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel ungünstig auf die Bildung von höheren Fettsäuren und Cholesterin auswirken. Bei der Glykolyse wird außerdem aus

DPN ⟶ DPNH bei der Triosephosphatdehydrierung gebildet. DPNH, wie auch TPNH ist als Wasserstoffdonator bei den Hydrierungsschritten der Fettsäuresynthese notwendig.

Mehreren japanischen Autoren zufolge treten bei Zugabe von Gallensäuren Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel auf. So konnten FUZITA, FUZIWARA und andere 1932 nachweisen, daß Gallensäuren die Glykogenbildung steigern, während die Glykolyse gehemmt ist. Die glykogenetische Wirkung der Cholsäure soll so stark wie die des Insulins sein. Sie fanden ferner, daß in der Leber die Glykogenneubildung aus Fettsäuren durch Zugabe von Cholsäure eine gewisse Steigerung erfährt. Es ist möglich, daß dieser Effekt bei unseren Versuchen eine Rolle spielt, doch wurden aufgebaute C^{14}-Fettsäuren durch Zugabe von Galle nur wenig vermindert.

WERTHESSEN konnte bei Versuchen an der Kalbsaorta 1959 nachweisen, daß die Cholesterinsynthese der Aortenwand mit dem Glukoseverbrauch synchron geht. Durch geringere Glykolyse wird weniger ATP und TPNH/DPNH gewonnen, so daß dies zwangsläufig eine Verminderung des Aufbaus an Fettsäuren und Cholesterin ergeben muß.

Für die Synthese ist aber auch das Verhältnis der reduzierten zu den oxydierten Cofermenten von Bedeutung. So kann eine Minderung im Aufbau eintreten, wenn das Enzymsystem oder das Cytochromoxydasesystem durch die Gallensäuren gestört wird. Wie auch HARTMANN 1957 bei seinen Studien über die Hepatitis zu dem Schluß kam, daß Enzymmangel, Substrathunger, sowie Mangel an ATP als P-Donator und DPNH oder TPNH als H-Donator, sowie Mangel an Cytochrom die Synthese hemmend beeinflussen. Unsere Versuche zeigten wohl eine absolute Verminderung des ATP-Gehaltes. Dennoch erklärt dies die starke Hemmwirkung nicht allein, da ja noch relativ genügend ATP vorhanden ist, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Möglicherweise spielt hier der hohe Eigenstoffwechsel der Sterine herein, der Energie wie auch das Enzymsystem verbraucht.

HAHN entdeckte 1943 bei seinen Versuchen, daß Heparin die alimentäre Lipämie beseitigen kann. Man fand als wirksame Substanz einen Heparinklärfaktor, der Fermentcharakter besitzt und die Bindung des Neutralfettes zu einem Fettsäure-Albumin-Komplex bewirkt. Auch bei den hemmenden Einflüssen der Gallensäuren wäre ein solcher Mechanismus zu diskutieren.

Heute wird ein enger Zusammenhang zwischen der Atherosklerose und Störungen des Fettstoffwechsels als erwiesen angesehen; denn in den meisten Fällen von Spontan-Atherosklerose zeigt sich eine Erhöhung des Serum-Cholesterins und der Serum-Lipoproteide. Da nun Gallensäuren die Synthese von höheren Fettsäuren und Cholesterin in vitro hemmen und eine andere Arbeitsgruppe des Isotopenlabors bei in vivo Versuchen an Tauben die gleiche Wirkung feststellen konnte, wäre es zweckmäßig, ähnliche Versuche an anderen Versuchstieren und an Menschen durchzuführen. Bei erfolgreichem Verlauf dieser Versuche hätte man vielleicht ein Mittel in der Hand, die Hyperlipämie und damit die Atherosklerose wirksam hintanzuhalten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Gallenflüssigkeit besitzt eine große Bedeutung in sekretorischer wie auch in exkretorischer Hinsicht. Wichtig ist sie vor allem für die Resorption der Lipoide.

Nach Beschreibung der einzelnen Syntheseschritte beim Aufbau der höheren Fettsäuren und des Cholesterins aus aktivierter Essigsäure und einer Betrachtung über die Stellung des ATP im intermediären Stoffwechselgeschehen wird die Versuchsanordnung geschildert.

Mit Hilfe eines aus Taubenlebern gewonnenen zellfreien Enzymsystems werden aus C^{14}-Acetat unter Zugabe von 0,006 m $MgCl_2$ und 0,01 m Natriumcitrat höhere Fettsäuren und Cholesterin aufgebaut, die infolge ihrer Radioaktivität im GEIGER-MÜLLER'schen Zählrohr quantitativ bestimmt werden.

Galle wurde meistens in Form eines Trockenpulvers zugesetzt. Zur Bestimmung der Wirksamkeit der einzelnen Gallebestandteile verwendeten wir die Substanzen in Reindarstellung. Die Zugabe von Galle ergibt eine starke Hemmung der Synthese. Bei Verwendung von 1 mg pro Ansatz werden die Fettsäuren um durchschnittlich 70 % vermindert, während die Cholesterinsynthese um 57 % gehemmt wird. Eine große Anzahl von Gallenbestandteilen, insbesondere die Gallensäuren, zeigen ähnliche Hemmwirkung.

Der ATP-Spiegel ist in allen Fällen deutlich gesenkt. Bekanntlich vermögen die Gallensäuren den Lipidgehalt des Blutes zu verringern. Bislang wurde diese Erkenntnis auf physikalische Effekte zurückgeführt. Nach unseren Ergebnissen muß jedoch ein Einfluß chemischer Natur angenommen werden, der möglicherweise in einer Minderung der ATP und TPNH bzw. DPNH-Bereitstellung, in einer verstärkten Umwandlung von Fettsäuren in Kohlenhydrate, sowie in einem Mangel an Enzym oder an Cytochrom besteht.

Auf den Zusammenhang zwischen Atherosklerose und Lipämie wurde hingewiesen.

BLADERGROEN, W.: Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge (1955)

BLOCH, K., BERG, B.N. und RITTENBERG, D.: J. biol. chem. 149, 511 (1943)

BLOCH, K.: Vit. and Horm. 15, 119 (1957)

BRADY, R.O. und GURIN, S.: J. biol. chem. 199, 421 (1952)

BRAND, V.v. und HELMREICH, E.: Biochem. Zeitschr. 328, 146 (1956)

COLP, R. und DOUBILET, H.: Arch. Surg. 33, 913 (1939)

CORNFORTH, J.W. und POPJAK, G.: Brit. med. Bull. 14, 221 (1958)

ENTENMANN, C., LERNER, S.R., CHAIKOFF, I.L. und DAUBEN, W.G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 70, 364 (1949)

FLASCHENTRÄGER, B. und LEHNARTZ, E.: Lehrbuch der Physiol. Chemie (1956)

FOSSEL, M.: Pflügers Arch. 228, 764 (1931)

FUZITA: Der Einfluß der Gallensäuren auf die Assimilation von Zucker, ref. chem. Abstr. 25, 1570 (1931)

FUZIWARA: Die Glykogenbildung in der Leber unter dem Einfluß von Gallensäuren und Hormonen, ref. chem. Abstr. 26, 3565 (1932)

GURIN, S. und BRADY, R.O.: Rec. Progr. inHorm. Research 8, 511 (1953)

HARTMANN, F.: Ref. aus Verhandlungen der Dtsch. Ges. f. inn. Med. 63 Kongress (1957)

HAHN, P.F.: Science 98, 19 (1943)

HELMREICH, E., HOLZER, H., LAMPRECHT, W., GOLDSCHMIDT, St.: Hoppe-Seylers Z. 297, 113 und 297, 1 (1954)

HENNING, U.: Dtsch. med. Wschr. 84, 760 (1959)

HEVESY, G.v.: Doc. Rheumat. Geigy Nr. 6, 35

HOAGLAND, M.B., und NOVELLI, G.D.: J. biol. chem. 207, 767 (1954)

JOBST, H. und BRÜCKEL, K.W.:	Atherosklerose und Fettstoffwechsel, Laevosan-Ges. Boehringer
KOLCKAR, H.M. und KLENOW, H.:	Ann. Rev. Biochem. 23, 527 (1957)
KNOOP, F.:	Beitr. chem. Physiol. und Pathol. 6, 150 (1904)
KREUTZBERG, J.:	Riedel Archiv 6, 87 (1953)
LANG, K.:	Intermediärstoffwechsel (1952)
LEUTHARDT, F.:	Lehrbuch der Physiol. Chemie (1959)
LIPMANN, F.:	Acetyl-phosphate, Adv. Enzymol. 6, 231 (1946)
LIPMANN, F.:	Adv. Enzymol. 1, 99 (1941)
LYNEN, F. und OCHOA, S.:	Biochim. Biophys. Acta 12, 299 (1953)
LYNEN, F.:	Angew. Chemie 67, 463 (1955)
LYNEN, F.:	Ann. Rev. of Biochem. 24, 653 (1955)
LYNEN, F., DECKER, K., WIELAND, O. und RHEINWEIN, D.:	Biochem. problems of lipids (1956)
MUNOZ, I.M. und LELOIR, L.F.:	J. of biol. chem. 147, 355 (1943)
PINCUS, G.:	Hormones and Atherosclerosis (1959)
POLONOVSKI, M. u. BOURRILLON, R.:	Bull. Soc. chim. biol. 34, 703 (1952)
POPJAK, G.:	Brit. Med. Bull. 14, 3 (1958)
RAPPERT, E.:	Therapie der Gegenwart 8, 352 (1939)
SCHETTLER, G. und JOBST, H.:	Dtsch. Med. Wschr. 80, 1077 (1955)
STERN, J.R. und del CAMPILLO, A.:	J. Amer. Chem. Soc. 75, 2277 (1953)
WERTHESSEN, N.T.	siehe PINCUS 1959, 131, 861 (1956)
WIELAND, O.:	Klin. Wochenschrift 17/18, 385 (1954)
ZIEGLER, E.:	Materia Med. Nordmark VI/8 - VII/6

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Medizinischen Poliklinik München durchgeführt.

Die Möglichkeit, am Isotopenlabor arbeiten zu dürfen, verdanke ich Herrn Prof. Dr. W. SEITZ.

Frau Dr. Dr. v. BRAND danke ich für die Einführung in die Technik der Versuche; wie ich auch den med. techn. Assistentinnen Fräulein Thöring und Fräulein v. Kutzschenbach für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente Dank schulde.

LEBENSLAUF

Am 25. Juli 1935 wurde ich in Falkenau a. d. Eger geboren. Von 1941 bis 1945 besuchte ich die dortige Volksschule. Im Jahre 1946 wurde ich aus dem Sudetenland nach Bayern ausgewiesen. Hier bestand ich am Neuen-Realgymnasium in München am 19. Juli 1956 die Reifeprüfung.

Vom Wintersemester 1956/57 an studierte ich an der Medizinischen Fakultät in München. Am 24. Februar 1959 bestand ich hier die Med. Vorprüfung. Nach weiterem klinischem Studium unterzog ich mich vom 4. März 1962 bis 6. September 1962 dem Medizinischen Staatsexamen.